

単糖，および二糖を修飾糖とした牛血清アルブミンおよび β -ラクトグロブリンの糖化修飾に関する研究

矢 島 絢 介・小野寺 秀 一・竹 田 保 之
加 藤 勲・塩 見 徳 夫

Study of the modification of bovine serum albumin and
 β -lactoglobulin by Maillard reaction using mono- and di-saccharides

Kensuke YAJIMA, Shuichi ONODERA, Yasuyuki TAKEDA,
Isao KATO, Norio SHIOMI

酪農学園大学紀要 別 刷 第 32 卷 第 1 号

Reprinted from

”Journal of Rakuno Gakuen University” Vol.32, No.1 (2007)

単糖, および二糖を修飾糖とした牛血清アルブミンおよび β -ラクトグロブリンの糖化修飾に関する研究

矢 島 絢 介・小野寺 秀 一^{*1}・竹 田 保 之^{*2}
加 藤 勲^{*3}・塩 見 徳 夫^{*1}

Study of the modification of bovine serum albumin and
 β -lactoglobulin by Maillard reaction using mono- and di-saccharides

Kensuke YAJIMA, Shuichi ONODERA^{*1}, Yasuyuki TAKEDA^{*2},
Isao KATO^{*3}, Norio SHIOMI^{*1}
(June 2007)

1912 年, フランスの化学者ルイス・メイラードがペプチド, タンパク質などのアミノ化合物中のアミノ基と, 糖の還元基との間で反応が生じることを発見した。この反応はメイラード反応と名付けられ, 今日まで約 100 年間にわたり主に食品化学の分野を中心に研究が継続されてきた。本反応は, シッフ塩基, アマドリ転移生成物などの反応中間体を経て, 最終的にメラノイジンと呼ばれる褐色物質を生じるとされているが, 多くの素反応から成り立っていることからその全容はいまだに完全には解明されていない。メラノイジンは多くの食品の製造過程において生じており, 特徴的な呈色を示すため味噌・醤油などにおいてはその食品を特徴づける成分として広く受け入れられている。非酵素的褐変が好ましくないものとして問題視される場合¹⁾も多いが, 近年ではメイラード反応を積極的に利用したタンパク質の糖化修飾によって, 抗酸化活性の向上^{2,3)}, 抗原性の低下⁴⁾, 乳化安定性の向上^{5,6)}, タンパク質の熱安定性の向上⁷⁾など多岐に渡るタンパク質の機能改変が報告されており, タンパク質の高機能化へ向けた取り組みとして注目を集めている。

一方, 我が国においては, チーズの消費量は増大しているものの飲用乳の消費が落ち込んでおり, 消

費者の期待に応えられる乳製品の開発により, 積極的に牛乳の消費拡大を図ることが急務である⁸⁾。近年, 健康志向の高まりに伴い食品の第三次機能が注目されている。乳製品においてもこの傾向は同様であり, 乳および乳成分の高機能化は有効な手段であると考えられる。そこで本研究では, モデルタンパク質として乳中に含まれる乳清タンパク質である β -ラクトグロブリン (β -LG) に注目した。乳清タンパク質はチーズ製造の副産物として大量に排出されており, 様々な取り組みが行われているものの, 未だ産業廃棄物として大量に廃棄処分されているのが現状である。また, β -LG は牛乳に含まれるアレルゲンとして知られており, 低アレルゲン化へ向けた取り組みも盛んに行われている。本研究では, β -LG の低アレルゲン化などを含む栄養生化学的機能改変を目的とし, その基礎的研究を行うこととした。

牛乳の加熱処理によって乳中のタンパク質とラクトース間で比較的容易にメイラード反応が生じることが知られている¹⁾。また, β -LG の機能改変については多糖などの重合度の高い糖を用いる研究例が多く, オリゴ糖を修飾糖として用いる研究は少ない。そこで本研究では, メイラード反応を利用した β -LG への機能性オリゴ糖の導入を試み, その構造分

2006 年度酪農学園大学大学院酪農学研究科食品栄養科学専攻修士課程修了

Department of Dairy Science Research, Rakuno Gakuen University Graduate School, 582 Bunkyo-dai-Midorimachi, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

^{*1} 酪農学園大学酪農学部食品科学科食品栄養化学研究室

Department of Food Science (Food and Nutrition Chemistry), Faculty of Dairy Science, Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyo-dai-Midorimachi, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

^{*2} 酪農学園大学酪農学部食品科学科乳製品製造学研究室

Department of Food Science (Milk Science and Technology), Faculty of Dairy Science, Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyo-dai-Midorimachi, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

^{*3} 酪農学園大学環境システム学部生命環境学科水質化学研究室

Department of Biosphere and Environmental Sciences (Water Chemistry), Faculty of Environmental systems, Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyo-dai-Midorimachi, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

析を行った。なお、 β -LGに糖分子を導入する前に、最適な修飾糖および修飾条件を検討するため、牛血清アルブミン (BSA) を用いて数種の単糖、および二糖 (グルコース、ラクトース、マルトース、フルクトース、キシロビオース) の反応性について比較検討を行ったので、その結果についても報告する。

材料および方法

(1) 材 料

BSA, β -LG (Sigma), グルコース, ラクトース, マルトース, フルクトース (ナカライテスク株式会社) は、それぞれ分析用特級試薬を用いた。キシロビオースは、東和化成工業株式会社製のものを使用した。

(2) メイラード反応の誘導

タンパク質溶液、各種の糖溶液をそれぞれ終濃度 5.0 mg/ml となるよう混合し、 -80°C 、4 日間凍結乾燥した。各凍結乾燥粉末を直ちに 40°C 、相対湿度 30~40% の条件下、インキュベーター内で 24 時間静置し、メイラード反応を誘導した。凍結乾燥粉末中の未反応糖は、セロハンチューブ (ダイアライシスメンブラン 36, 和光純薬株式会社) を用い、蒸留水に対して 4°C 、24 時間、外液を交換しながら透析を行って除去した。さらにセントリプレップ YM-50 (Millipore) を用いて 3,000 rpm で 10 分間、限外ろ過を行った。この限外ろ過の操作を 3 回繰り返し、修飾タンパク質を含む内液を回収した。

(3) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

合成した修飾タンパク質の分子量を分析するため、ポリアクリルアミドを支持体とした SDS-PAGE 分析を行った。本実験では濃縮ゲルと分離ゲルを二層ゲルとする Laemmli 法⁹⁾に従い電気泳動を行い、分離ゲルのアクリルアミド濃度を 10% とし、濃縮ゲルのアクリルアミド濃度は 3.75% とした。泳動後のタンパク質染色は、CBB R-250 (ナカライテスク株式会社) により行った。

(4) MALDI TOF-MS 分析

より詳細に分子量を分析するため、MALDI TOF-MS による分析を行った。マトリックスとしてシナピン酸 (Sigma) を用いた。

(5) ϵ -アミノ基の定量

Hernandez らの方法¹⁰⁾に従い、*o*-フタルアルデヒドと *N*-アセチル-L-システインを用いて蛍光ラ

ベル化することにより、修飾タンパク質に含まれる遊離 ϵ -アミノ基の定量を行った。なお、未処理のタンパク質の遊離 ϵ -アミノ基含量を 100% とした。

(6) 修飾糖の定量

フェノール硫酸法¹¹⁾により、修飾タンパク質に含まれる中性糖の定量を行った。

(7) 等電点電気泳動 (IEF)

各修飾タンパク質の等電点を分析するため、PhastGel (IEF 4-6.5, Amersham Bioscience) を用いて IEF を行った。泳動は PhastSystem (Amersham Bioscience) を用いて行い、固定液は 20% トリクロロ酢酸、洗浄液はメタノール、酢酸、蒸留水を体積比 3:1:6 で混合した溶液を用いた。泳動後のタンパク質染色法として、PhastGel Blue R (Amersham Bioscience) を用いた CBB 染色を行った。

結 果

1. BSA の糖化修飾

SDS-PAGE 分析の結果、グルコース、ラクトース、マルトース、フルクトースを修飾糖とした場合、修飾タンパク質の分子量はネイティブな BSA の分子量と比較して、あまり大きな変化は認められなかった。一方、キシロビオースを修飾糖とした場合には、修飾タンパク質の分子量がネイティブな BSA の分子量と異なることが確認できた (Fig. 1)。各修

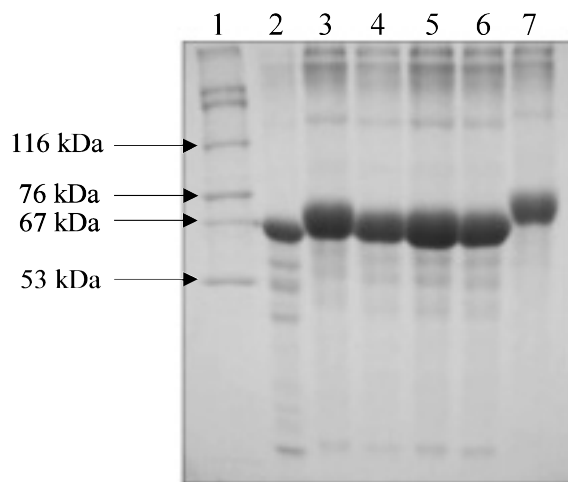


Fig. 1 SDS-PAGE of the conjugated BSA. After bovine serum albumin (BSA) was modified with saccharides, each protein (10 μg) was analyzed by SDS-PAGE.⁹⁾ Lane 1, protein marker; lane 2, native BSA; lane 3, BSA-glucose; lane 4, BSA-maltose; lane 5, BSA-lactose; lane 6, BSA-fructose; lane 7, BSA-xylobiose

飾タンパク質はブロードなバンドとして現れたため、この分析結果から正確な分子量を算出することは不可能であった。これは糖化修飾程度の違い、すなわち修飾タンパク質の分子量の不均一性に起因したものであると考えられたため、より詳細に分子量の測定を行うため、MALDI TOF-MS 分析を行った。その結果、ネイティブな BSA は分子量 66,464 をピークとして比較的狭い範囲に分布していたのに対し、キシロビオースを修飾糖とした修飾タンパク質では 74,963 に最も高いイオンピークを与えとともに広範囲の分子量分布を示した (Fig. 2)。このことより、24 時間の反応により分子量が約 8,500 増加したことが確認された。キシロビオースの分子量を 282 とすると、BSA 1 分子当たり約 30 分子のキ

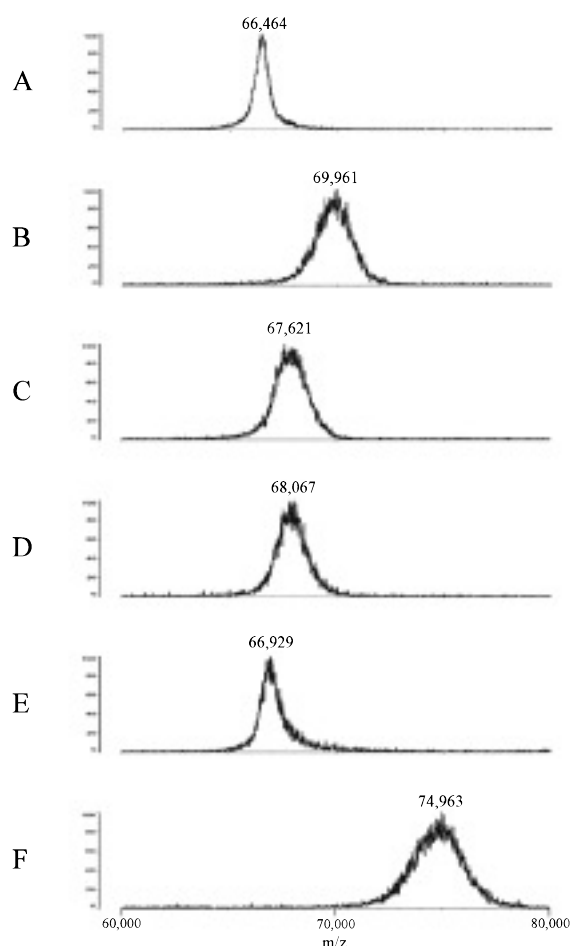


Fig. 2 MALDI TOF-MS spectra of the conjugated BSA.

A mixture of each protein (0.6 μ g) and 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (10 μ g) was analyzed.

A, native BSA; B, BSA-glucose; C, BSA-maltose; D, BSA-lactose; E, BSA-fructose; F, BSA-xylobiose.

シロビオースが結合したと推定された。また Fig. 3 より、修飾タンパク質の遊離 ϵ -アミノ基は、キシロビオースを修飾糖とした時に最も大きく減少したことが示された。以上の結果より、キシロビオースを修飾糖とした場合に、最も効率良くタンパク質の修飾反応が進行したと判断された。

2. β -LG の糖化修飾

SDS-PAGE 分析の結果、 β -LG とキシロビオース間でメイラード反応が生じ、分子量が増加することが確認された (Fig. 4)。MALDI TOF-MS 分析の結果より、ネイティブな β -LG の分子量は 18,365 であったのに対し、キシロビオースで修飾した β -LG (β -LG-xylobiose) は 21,202 に最も高いイオンピークを与えた (Fig. 5)。この結果から、24 時間の反応により分子量が約 2,800 増加したことが確認された。キシロビオースの分子量を 282 とすると、 β -LG 1 分子当たり約 10 分子のキシロビオースが結合したと推定された。

フェノール硫酸法による糖の定量の結果より、 β -LG-xylobiose 1 mg 当たり約 122 μ g の糖が含まれていることが確認され、また、ネイティブな β -LG 1 mg 中に含まれる糖質は約 4 μ g であったことから (Fig. 6)、 β -LG-xylobiose 1 mg 中では新たに約 118 μ g のキシロビオースが結合したと算出された。さら

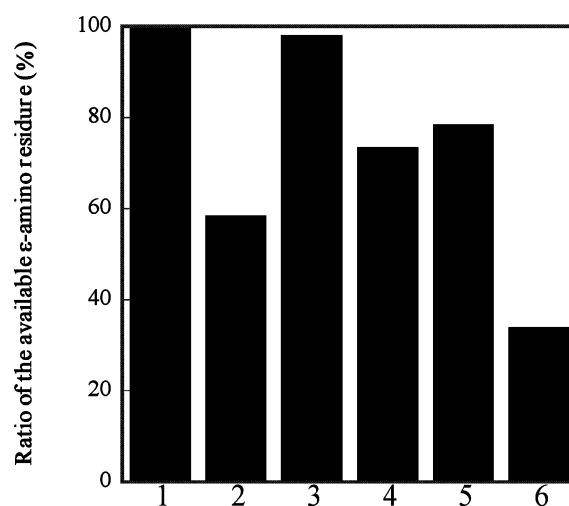


Fig. 3 Reduction of the available ϵ -amino group in BSA by Maillard reaction.

An available ϵ -amino group in each protein (10 mg) was measured by the method of Hernandez.¹⁰⁾

Lane 1, native BSA; lane 2, BSA-glucose; lane 3, BSA-maltose; lane 4, BSA-lactose; lane 5, BSA-fructose; lane 6, BSA-xylobiose.

に、蛍光ラベル化法による ϵ -アミノ基の定量により β -LG の遊離 ϵ -アミノ基は約 46.2% 減少したと算出され (Fig. 7), IEF 分析の結果より, β -LG-xylobiose の等電点はネイティブな β -LG と比べ低いことが確認された (Fig. 8)

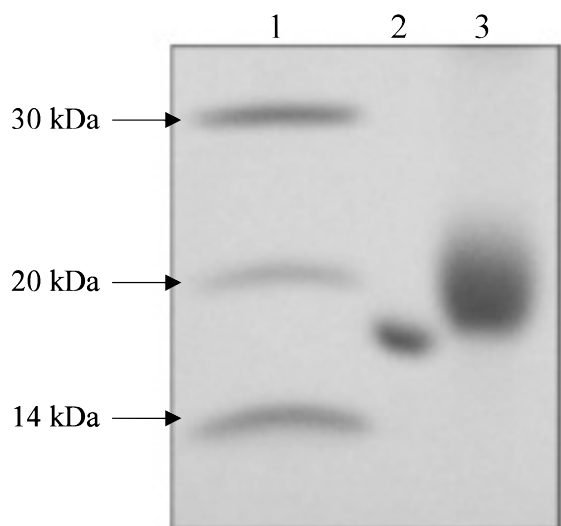


Fig. 4 SDS-PAGE of the β -LG-xylobiose conjugate. After β -lactoglobulin (BSA) was modified with xylobiose, the protein (10 μ g) was analyzed by SDS-PAGE.⁹⁾ Lane 1, protein marker; lane 2, native β -LG, lane 3, β -LG-xylobiose.

考 察

恒温環境下, 凍結乾燥粉末のタンパク質と糖の間でメイラード反応を誘導することに成功した。非酵素的褐変に関する研究でキシロースが非常に高い反

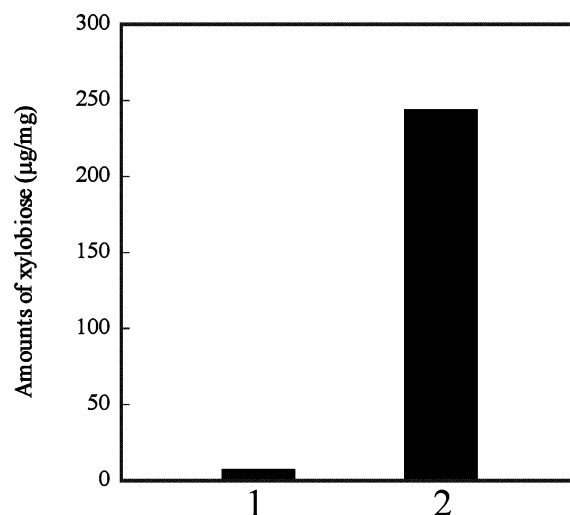


Fig. 6 Glycation between β -LG and xylobiose by Maillard reaction. A neutral sugar contained in each protein (1.0 mg) was measured by phenol-sulfuric acid method.¹¹⁾ Lane 1, native β -LG; lane 2, β -LG-xylobiose.

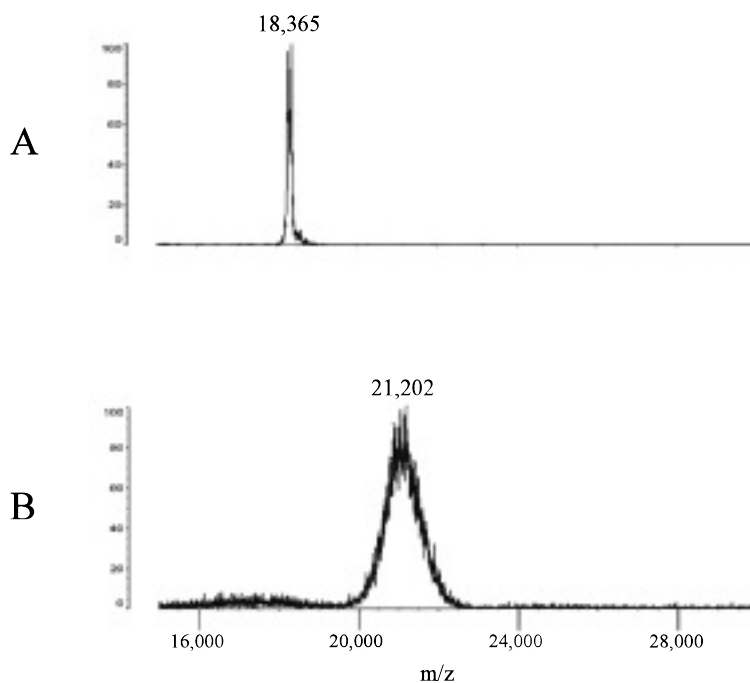


Fig. 5 MALDI TOF-MS spectra of β -LG and β -LG-xylobiose. A mixture of each protein (0.6 μ g) and 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (10 μ g) was analyzed. A, native β -LG; B, β -LG-xylobiose

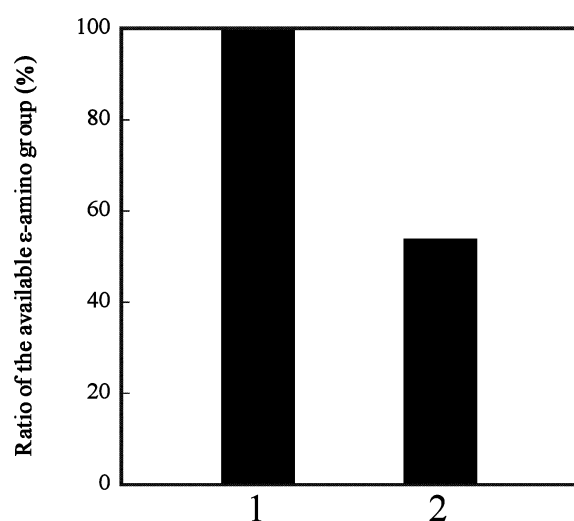


Fig. 7 Reduction of the available ϵ -amino group in β -LG by Maillard reaction. An available ϵ -amino group in each protein (10 mg) was measured by the method of Hernandez.¹⁰⁾ Lane 1, native β -LG; lane 2, β -LG-xylobiose

応性を有していることが報告されているが¹²⁾, 本研究でキシロースを基本単位とするキシロビオースがメイラード反応においても高い反応性を有していることが確認され, グルコース, ラクトース, マルトース, フルクトースよりも効率良く BSA を修飾することが明らかになった (Fig. 1, 2)。

Fig. 4, 5 より, β -LG とキシロビオース間でメイラード反応が生じたことが示唆された。J-M Chobert et al.ら¹³⁾は β -LG をリボース, アラビノースなどで糖化修飾した修飾タンパク質の修飾アミノ酸残基数を算出したところ, リボースを修飾糖とした修飾タンパク質では 11 分子, アラビノースを修飾糖とした修飾タンパク質では 9 分子のアミノ基が修飾されていると報告している。これらの修飾タンパク質は極めて高い DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ラジカル捕捉能を有していることが明らかにされており, 本研究で調製した β -LG-xylobiose も同程度の糖化修飾がなされていると推定でき, 高い DPPH ラジカル捕捉能を有していることが考えられる。

また, IEF 分析の結果 (Fig. 8) より, 糖化修飾により β -LG の等電点が低下したことが分かった。Maitena ら⁷⁾はメイラード反応を利用してコイ由来ミオシンをアルギン酸オリゴ糖により糖化修飾したところ, 修飾タンパク質の等電点はネイティブなミオシンと比べ, 低いと推定している。これら等電点の低下は, キシロビオースが ϵ -アミノ基に結合する

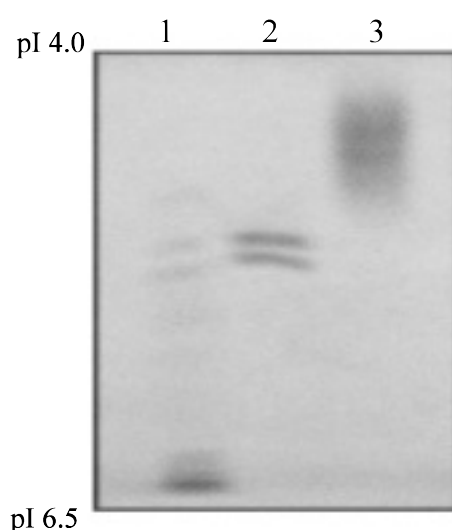


Fig. 8 IEF of the β -LG-xylobiose conjugate. Each protein (4.0 μ g) was analyzed with Phast-Gel IEF 4-6.5 and PhastSystem apparatus. Lane 1, protein marker; lane 2, native β -LG; lane 3, β -LG-xylobiose.

ことに起因すると考えられる。

すでに, 牛乳の理化学的性質が明らかになっている¹⁴⁾ことから, 今後は β -LG-xylobiose の理化学的性質を測定し, 乳成分として表面張力の特徴がどのように変化するかについて検討する予定である。また, β -LG が乳中に含まれるアレルゲンであることが知られているため, β -LG-xylobiose が免疫機能に与える影響についても検討する予定である。

また, キシロビオースが *B. adolescentis*, *B. infantis*, *B. longum* などの菌により資化され腸内細菌叢を改善することが報告されており¹⁵⁾, プレバイオティクスとして注目を集めていることから, キシロビオースのプレバイオティクスとしての機能性がタンパク質と結合することにより変化するかどうか非常に興味深く, 今後の重要な検討課題であると考えられた。

要 約

本研究では, メイラード反応を利用したタンパク質の糖化修飾に関する基礎的研究として, BSA と数種の単糖, および二糖間でメイラード反応を誘導し, 糖化修飾に最適と考えられた糖について, 代表的な乳清タンパク質である β -LG に導入し, 得られた修飾タンパク質の構造について調べた。

BSA の糖化修飾において, SDS-PAGE 分析, および MALDI TOF-MS 分析の結果からキシロビオースが最も効率良く反応したことが分かった。このキ

シロビオースを修飾糖として β -LG への導入を試みたところ、SDS-PAGE 分析、MALDI TOF-MS 分析によりメイラード反応が生じたことが示唆された。フェノール硫酸法により糖の定量を行ったところ、 β -LG-xylobiose 1 mg あたり約 118 μ g のキシロビオースが結合していると算出され、蛍光ラベル化法による ϵ -アミノ基の定量により β -LG の遊離 ϵ -アミノ基は約 46.2% 減少していた。IEF 分析により、 β -LG-xylobiose の等電点はネイティブな β -LG と比べ低いことが示された。

謝 辞

本研究の一部は、2007 年度酪農学園大学・酪農学園大学短期大学部共同研究の助成を受けたものである。

参 考 文 献

- 1) Thomas, M. E. C., Scher, J., D-Banon, S. and Desobry, S.: Milk Powders Ageing: Effect on physical and functional properties. *Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 297-322 (2004)
- 2) 中村宗一郎：ガラクトマンナンとの複合体形成による大豆たん白質由来の抗酸化剤の開発，大豆たん白研究，不二たん白質研究振興財団，3，334-339 (2000)
- 3) Chevalier, F., Chobert, J. M., Genot, C. and Haertlé, T.: Scavenging of free radicals, antimicrobial, and cytotoxic activities of the Maillard reaction products of β -lactoglobulin glycosylated with several sugars. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5031-5038 (2001)
- 4) Hattori, M., Miyakawa, S., Ohama, Y., Kawamura, H., Yoshida, T., To-o, K., Kuriki, T. and Takahashi, K.: Reduced immunogenicity of β -lactoglobulin by conjugation with acidic oligosaccharides. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4546-4553 (2004)
- 5) Dickinson, E. and Galazka, V. B.: Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of β -lactoglobulin with polysaccharides. *Food Hydrocoll.* 5, 281-296 (1991)
- 6) Kim, H. J., Choi, S. J., Shin, W. S. and Moon, T. W.: Emulsifying properties of bovine serum albumin-galactomannan conjugates. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1049-1056 (2003)
- 7) Maitena, U., Katayama, S., Sato, R. and Saeki, H.: Improved solubility and stability of carp myosin by conjugation with alginate oligosaccharide. *Fish. Sci.* 70, 896-902 (2004)
- 8) 矢坂雅允，小泉勇，鈴木忠敏：どうする牛乳消費の減退，酪農ジャーナル，酪農学園大学エクステンションセンター，59，11-19 (2006)
- 9) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685 (1970)
- 10) Hernandez, M. J. M. and A-Coque, M. C. G.: Available lysine in protein, assay using o-phthalaldehyde/N-acetyl-L-cysteine spectrophotometric method. *J. Food. Sci.* 57: 503-507 (1992)
- 11) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Robers, and P. A, Smith, F: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356 (1956)
- 12) Lievonen, S. M., Laaksonen, T. J. and Roos, Y. H: Nonenzymatic browning in food models in the vicinity of the glass transition: Effects of fructose, glucose, and xylose as reducing sugar. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7034-7041 (2002)
- 13) Chobert, J. M., Gaudin, J. C., Dalgalarrodo, M. and Haertlé, T.: Impact of maillard type glycation on properties of beta-lactoglobulin. *Biotechnol. Adv.* 24, 629-632 (2006)
- 14) 仁木良哉：乳成分として水の特性，*Milk Science* (日本酪農科学会誌)，学会出版センター，55，43-54 (2006)
- 15) Okazaki, M., Fujikawa, S. and Matsumoto, N.: Effect of xylooligosaccharide on the growth of Bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora.* 9, 77-86 (1990)

Summary

Two proteins, bovine serum albumin (BSA) and β -lactoglobulin (β -LG) were modified, by Maillard reaction, with the monosaccharides: glucose or fructose, and the disaccharides: maltose, lactose or xylobiose. The BSA was effectively modified by the reaction with xylobiose at 40 °C for 24 h. The results of

SDS-PAGE and MALDI TOF-MS analyses have shown that the relative molecular mass (M_r) of the BSA-xylobiose conjugate increased and was estimated to be 8,500.

Similarly, the β -LG was also modified with xylobiose under the same reaction conditions. The M_r of major type of the β -LG-xylobiose conjugate obtained was estimated to be 21,202 by MALDI TOF-MS analysis. The sugar content was also calculated and was 118 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of β -LG-xylobiose conjugate. The available ϵ -amino group of β -LG decreased by 46.2%. The Maillard reaction also shifted the isoelectric point of the β -LG to acid side.